

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4196318号
(P4196318)

(45) 発行日 平成20年12月17日(2008.12.17)

(24) 登録日 平成20年10月10日(2008.10.10)

(51) Int. Cl.	F 1	
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q	1/04
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N	1/20 A
C 1 2 N 1/02 (2006.01)	C 1 2 N	1/02

請求項の数 1 (全 9 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2002-75166 (P2002-75166)</p> <p>(22) 出願日 平成14年2月13日 (2002. 2. 13)</p> <p>(65) 公開番号 特開2003-235545 (P2003-235545A)</p> <p>(43) 公開日 平成15年8月26日 (2003. 8. 26)</p> <p>審査請求日 平成16年12月24日 (2004. 12. 24)</p> <p>前置審査</p>	<p>(73) 特許権者 591045677 関東化学株式会社 東京都中央区日本橋本町3丁目2番8号</p> <p>(72) 発明者 金子 孝昌 東京都中央区日本橋本町3丁目2番8号 関東化学株式 会社内</p> <p>審査官 福澤 洋光</p> <p>(56) 参考文献 特開2002-281959 (JP, A)) 特開2000-342249 (JP, A)) Journal of Food Protection, 1998 年, Vol.61, No.8, p.948-952 最終頁に続く</p>
--	---

(54) 【発明の名称】 大腸菌用選択分離培地および分離方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象とする大腸菌の生育を抑制せずかつシュウドモナス属細菌の生育を抑制する選択剤を含む培地で試料を培養し、シュウドモナス属細菌の生育を抑制し大腸菌を選択的に分離することを特徴とする大腸菌の選択分離方法であって、試料が糞便であること、大腸菌が腸管出血性大腸菌O157であること、および選択剤がセフィキシム、亜テルル酸塩およびセフスロジンであることを特徴とする、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は大腸菌、特に三類感染症原因菌である腸管出血性大腸菌O157の選択分離培地に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

大腸菌による感染症の治療においては、その感染症の原因菌を同定し、その原因物質に適合した処置を迅速に行うことが重要である。腸管出血性大腸菌のうち特に血清型O157は、米国、カナダおよびヨーロッパにおいて多くの食中毒の原因となっている。我が国においても、1996年の大規模食中毒を境に、各種食材（特に牛肉）がこれらの食中毒に

関与している。この大腸菌は血液様の下痢を特徴とする出血性大腸炎を引起し、非常に重篤な腎臓の合併

症（溶血性尿毒症）に進む恐れがあるため、主要な公衆衛生の課題となっている。特に腸管出血性大腸菌O157は食品従事者を中心とした保菌者検索（糞便検査）や食品品質検査に力を入れて行われている。

【0003】

腸管出血性大腸菌O157の感染が疑われる場合または保菌者を検索する場合、確定診断のために糞便材料などを検査材料とし腸管出血性大腸菌O157の分離を行なう必要がある。この際必要となるのが腸管出血性大腸菌O157選択分離培地である。選択分離培地とは、できる限り標的微生物のみ生育できるように工夫された培地の総称であり、糞便材料のように多種の腸内細菌を多量に含む可能性のある検査材料を用いる場合には、特に選択性能は重要である。一般的には、共存する微生物に対して抑制的に作用し、標的微生物の生育に影響を与えない物質を選択物質として添加した培地を選択分離培地として利用する。

10

【0004】

たとえば、食品検体や糞便検体には腸管出血性大腸菌O157以外の多くの微生物が含まれており、これらのなかから腸管出血性大腸菌O157を分離培養するためには、選択分離培地を用いなければならない。従来技術の分離培地または選択分離培地は以下の通りである

【0005】

(1) 分離培地

1 SMAC (Sorbitol MacConkey) 寒天培地

20

グラム陰性且つソルビトール非発酵性もしくは遅発酵性であるすべての微生物の検査に利用される。選択性が低いため抗生物質を添加する場合もあるが、ソルビトール非発酵菌もしくは遅発酵菌による偽陽性を排除できない。鑑別試薬としてフルオロゲン (fluorogenic) 化合物もしくは色原体 (chromogenic) 化合物を添加することにより、 α -グルクロニダーゼを産生する微生物 (本質的に典型的な大腸菌) を除去することができる。

患者から分離した腸管出血性大腸菌O157のほとんどは24時間たってもソルビトールを発酵しない。又、 α -グルクロニダーゼ活性を持たない。これらの性質を利用し、臨床もしくは食物検体中における腸管出血性大腸菌O157のスクリーニングは、一次分離用培地としてソルビトール・マッコンキー寒天培地 (SMAC) が用いられている。

30

ソルビトール非発酵性もしくは遅発酵性の、疑わしいコロニー (無色～白色) を目視的に観察し、疑わしいコロニーを生化学的および血清学的検査により腸管出血性大腸菌O157と確認する。

【0006】

2 MUG加SMAC寒天培地

ソルビトール陰性、 α -グルクロニダーゼ陰性のコロニーを明らかにするための培地である。 α -グルクロニダーゼ活性の確認用としてMUG (4 - メチルウンベリフェリル - α -グルクロニド) が添加される。

【0007】

3 BCIG加SMAC寒天培地

40

ソルビトール陰性、 α -グルクロニダーゼ陰性のコロニーを明らかにするための培地である。 α -グルクロニダーゼ活性の確認用としてBCIG (5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドキシル - D - α -グルクロニド) が添加される。

【0008】

4 フルオロカルト大腸菌O157 : H7寒天培地 (商品名 : 関東化学 (株)) ソルビトール陰性、MUG陰性およびH₂S陰性のコロニーを明らかにするための、ソルビトール、MUGおよびチオ硫酸ナトリウム含有培地である。

【0009】

(2) 選択分離培地

CT - SMAC寒天培地

50

2種類の阻害剤（セフィキシムおよび亜テルル酸カリウム）を含有する、SMAC由来の培地である。これらの阻害剤はソルビトールを発酵しない多くの微生物、例えばプロテウス属、モルガネラ・モルガニイ（*Morganella morganii*）、プロビデンシア属、ハフニア・アルベイ（*Hafnia alvei*）等の発育を阻止するので、培地をより選択的なものにする。

【0010】

しかしながら前記（1）の分離培地は、腸管出血性大腸菌O157が他の共存微生物に比べ、保菌者糞便中および食品検体中に少量しか存在せずかつ類似の性状を示す偽陽性菌が多く含まれるため、感度および特異性が悪いという問題点があった。

【0011】

また、前記（2）の選択分離培地は、腸管出血性大腸菌O157以外のソルビトール非発酵菌および遅発酵菌、特に緑膿菌が高率に分離されてくる。それ故、このような選択分離培地から腸管出血性大腸菌O157を疑うコロニーを鑑別するのは熟練された技術が必要とされるため、コロニー性状から腸管出血性大腸菌O157の有無を判断することは困難となり、その後の同定試験の結果を待たざるを得ないという問題点があった。

【0012】

さらに、特開2000-342249の培地では、緑膿菌の発育を抑制することができず、緑膿菌による汚染が高い場合には、目的とする腸管出血性大腸菌O157が分離できない。また、腸管出血性大腸菌O157の発育阻害が認められるため、偽陰性が高く出る傾向にあった。

【0013】

一方、従来の腸管出血性大腸菌O157の検出は一般的には以下のような方法で行われている。

（1）食品検体の場合

検体を前培養培地ノボピオシン加mECブイオンで42で18～24時間前培養する。この前培養液の一部を腸管出血性大腸菌O157選択分離培地または分離培地に塗抹し、37、18～24時間培養し、平板培地上のコロニーを観察する。さらに平板培地上の腸管出血性大腸菌O157と思われるコロニーを釣菌し、腸管出血性大腸菌O157同定キットや生化学性状検査用鑑別培地に接種し、37、18～24時間培養し同定する。またこれらのコロニーや増菌液を用いて、抗血清による免疫学的試験やPCR法も行われている。

【0014】

（2）糞便検体の場合

糞便検体の一部を直接、腸管出血性大腸菌O157選択分離培地または分離培地に塗抹し、37、18～24時間培養し、平板培地上のコロニーを観察する。さらに平板培地上の腸管出血性大腸菌O157と思われるコロニーを釣菌し、腸管出血性大腸菌O157同定キットや生化学性状検査用鑑別培地に接種し、37、18～24時間培養し同定する。またこれらのコロニーを用いて、抗血清による免疫学的試験やPCR法も行われている。

かかる方法では、検査工程に分離培地もしくは選択分離培地を用いた分離培養という操作が必要なため、前述のごとく腸管出血性大腸菌O157に類似したコロニーを識別するのは困難である。特に緑膿菌が類似コロニーとして分離され、その後の同定試験の結果を待たなければならないという問題点があった。

【0015】

【発明が解決しようとする課題】

したがって、本発明の課題は、上記問題を解決し、糞便をはじめとする種々の検体中の大腸菌、特に腸管出血性大腸菌O157を感度良く、特異的かつ簡便に検出できる培地および分離方法を提供することにある。

【0016】

【発明を解決するための手段】

10

20

30

40

50

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を進める中で、基本培地に選択剤を含有させることにより上記課題が解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0021】

さらに、本発明は、前記培地のためのキットに関する。

【0022】

またさらに、本発明は、対象とする大腸菌の生育を抑制せずかつシュードモナス属細菌の生育を抑制する選択剤を含む培地で試料を培養し、シュードモナス属細菌の生育を抑制し大腸菌を選択的に分離することを特徴とする、大腸菌の選択分離方法であって、試料が糞便であること、大腸菌が腸管出血性大腸菌O157であること、および選択剤がセフィキシム、亜テルル酸塩およびセフスロジンであることを特徴とする、大腸菌の選択分離方法に関する。

10

【0023】

したがって、本発明によれば、偽陽性菌の混在による取りこぼしを回避することができ（高感度かつ特異的）、かつ大腸菌、特に腸管出血性大腸菌O157同定キットや生化学性状検査用鑑別培地に接種し同定する費用の削減に大きく貢献でき、さらには操作の手間および時間を削減でき、実用上意義深いものと言える。

【0024】

【発明の実施の形態】

本発明における対象とする大腸菌は、腸管出血性大腸菌、腸管毒素原性大腸菌、腸管侵入性大腸菌、腸管病原性大腸菌、腸管凝集接着性大腸菌など種々の大腸菌に適用することができるが、食中毒の原因菌とされている腸管出血性大腸菌O157が好適に用いられる。

20

【0025】

本発明の選択剤で生育が抑制されるシュードモナス属細菌は、*Pseudomonas aeruginosa*（緑膿菌）、*P. fluorescens*、*P. cepacia*、など種々の菌種があるが、腸管出血性大腸菌O157を選択的に分離する場合、緑膿菌の生育が好適に抑制される。

【0026】

本発明による培地は、対象とする大腸菌が感度よく生育する組成の培地であればいずれでもよい。具体的には、CT-SMAC寒天培地、SMAC培地、MUG加SMAC寒天培地培地、BCIG加SMAC寒天培地、フルオロカルト大腸菌O157:H7寒天培地（商品名：関東化学（株））、これらの培地に改変を加えたもの、例えば糖類を改変するなどした培地などが用いられる。中でも他の共存微生物の生育を抑制できるCT-SMAC寒天培地が好ましい。これらの培地は、培養に影響を与えないものであれば、寒天状、粉末状または液状のいずれの状態にも用いられる。

30

【0027】

本発明に用いられる選択分離培地の調製方法は、前記基本培地に精製水を加えて一定量とし、高圧滅菌後、冷却し、一定量の添加剤を添加することにより調製できる。具体的には、例えばSMAC寒天培地51.5gを精製水で1000mLとし、121で15分間滅菌する。滅菌後、約50に冷却し、セフィキシム0.05mg/L、亜テルル酸カリウム2.5mg/L、セフスロジン5mg/Lの濃度になるように添加して調製できる。

40

【0028】

本発明に用いられる選択剤は、セフィキシム、亜テルル酸塩およびシュードモナス属の生育を抑制し、大腸菌の生育を抑制しない抗生物質を含むものをいい、対象とする大腸菌の分離、培養に悪影響を与えないものであれば、他に何を含まなくてもよい。

【0029】

また、選択剤で用いられる亜テルル酸塩は、アルカリ金属やアルカリ土類金属の塩、たとえば、カリウム塩、カルシウム塩、ナトリウム塩、マグネシウム塩などが用いられる。使用勝手の観点からカリウム塩が好適に用いられる。その濃度は、対象とする大腸菌の分離、培養に影響を与えない濃度であればよく、好ましくは0.5~5mg/L、より好ましくは1~3mg/L、さらに好ましくは2~2.5mg/Lである。

50

【0030】

選択剤で用いられるセフィキシムの濃度は、対象とする大腸菌の分離に影響を与えない濃度であればよく、好ましくは0.01~0.19mg/L、より好ましくは0.03~0.10mg/Lである。

【0031】

CT-SMAC寒天培地のように、セフィキシム、亜テルル酸塩を既に含んでいる基本培地にあつては、対象とする大腸菌の分離、培養に影響を与えなければ、本発明による選択剤を加えてもよく、抗生物質のみを加えてもよい。一方、SMAC寒天培地のように、セフィキシムおよび亜テルル酸塩を含まない基本培地にあつては、本発明による選択剤を加えることにより選択的に対象とする大腸菌のみを分離することができる。

10

【0032】

本発明に用いられる抗生物質は、対象とする微生物の生育を抑制せず、シュードモナス属細菌の生育を抑制するものであれば何れでも良く、セフスロジン、セフトリアキソン、セフピラミド、セフォタキシム、セフトジジム、セフピミゾール、セフチゾキシム、セフメノキシムなどのセフェム系、ノボピオシン、バンコマイシン類などのテトラサイクリン系、ピペラシリン、カルベニシリンなどのペニシリン系などが用いられる。対象とする大腸菌が腸管出血性大腸菌O157であれば、緑膿菌の生育をほぼ完全に抑制するセフスロジンまたはノボピオシンが好ましく、より好ましくはセフスロジンが用いられる。これらの抗生物質は塩の形で用いることもできる。また、使用する抗生物質は、単独でもよく、複数を組み合わせてもよい。

20

【0033】

選択剤として用いられる抗生物質の濃度は、シュードモナス属細菌の生育を抑制する濃度であればよく、セフスロジンの場合、0.5~100mg/Lが好ましく、より好ましくは0.78~50mg/L、さらに好ましくは1.56~25mg/Lである。また、ノボピオシンの場合、好ましくは5~50mg/L、より好ましくは15~30mg/L、さらに好ましくは20~25mg/Lである。

【0034】

本発明による微生物の分離方法は、糞便を始めとする生体由来試料、食品由来試料、それら試料の増菌培養液などを前記のごとく調整した選択分離培地へ白金耳等を用いて塗抹し、35~37で18~24時間培養することにより目的とする微生物を分離することができる。

30

【0035】

また、本発明を実施するための試薬及び器材を携帯可能なキットの形態にしておくことは利便性の点で好ましい。このキットに、大腸菌を選択的に分離する試薬、例えば、選択剤、基礎培地、などの他、便検体摂取に必要な採便容器や採便棒、食品検査等の増菌培養に必要なストマック袋や増菌培地、また分離培養に必要な白金耳を持ち運び可能な容器に収納したものは、作業の簡便化および効率化の面においてさらに好ましい。さらに、選択剤、たとえばセフスロジン、セフィキシム、亜テルル酸塩の三剤のみを持ち運び可能な容器に収納したのも作業の簡便化、効率化の面で好ましい。

40

【0036】

【実施例】

以下、実施例によって本発明を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

〔実施例1〕

培地の作成

SMAC寒天培地(51.5g)に精製水を加え全量を1000mLとし、高圧滅菌(121、15分間)にかけた。約50に冷却し、以下に示す組成の本培地A添加試薬、本培地B添加試薬および対象となるCTを既定量添加した。試薬を良く混和し、シャーレに18mLずつ分注し、平板を作成した。

【0037】

本培地の基本組成(培地1000mLあたり)

50

ペプトン(20g)、ソルビトール(10g)、胆汁酸塩(1.5g)、塩化ナトリウム(5g)、ニュートラルレッド(0.03g)、クリスタルバイオレット(0.001g)、寒天(15g)、pH = 7.1 ± 0.1

【0038】

本培地Aの添加試薬(培地1000mLあたり)

亜テルル酸カリウム(2.5mg)、セフィキシム(0.05mg)、セフスロジン(5mg)

【0039】

本培地Bの添加試薬(培地1000mLあたり)

亜テルル酸カリウム(2.5mg)、セフィキシム(0.05mg)、ノボビオシン(20mg)

【0040】

対象となるCT添加試薬(培地1000mLあたり)

亜テルル酸カリウム(2.5mg)、セフィキシム(0.05mg)

【0041】

〔実施例2〕

腸管出血性大腸菌O157発育支持能結果

試験菌株懸濁液の希釈率を変え、各培地における腸管出血性大腸菌O157発育支持能を比較した。試験方法は、以下のように行った。

各種試験菌株をトリプトンソーヤ寒天培地(商品名:関東化学株式会社)に前培養(35℃、一夜培養)し、得られた集落を滅菌生理食塩水に懸濁させる。各試験菌株懸濁液を 10^{-7} まで10倍段階希釈し、各希釈系列を評価培地へ滴下(20μL)し培養する(35℃、18~24時間)。

【0042】

結果を表1に示す。表1は各培地における試験菌株懸濁液の各希釈倍率における発育菌数、色及びコロニーのサイズを示している。発育菌数の計測ができない場合は、++(一部コロニー融合のため計測不可)および+++ (ほとんどコロニー融合のため計測不可)で表記した。表1より、培地Aおよび培地Bは、培地CTと比較して同等かそれ以上に腸管出血性大腸菌O157が発育することが分った。また、コロニーサイズも同等であった。

【0043】

【表1】

35℃、18時間培養

10

20

30

Strain No.	Media	Dilution					Color	Size (mm)
		× 10 ⁻³	× 10 ⁻⁴	× 10 ⁻⁵	× 10 ⁻⁶	× 10 ⁻⁷		
1	CT	+++	+++	++	3 5	6	白濁	1.5
	B	+++	+++	++	4 0	5	白濁	1.0
	A	+++	+++	++	3 7	5	白濁	1.5
2	CT	+++	+++	++	2 5	0	白濁	1.5
	B	+++	+ - +	++	2 3	2	白濁	1.0
	A	+++	+++	++	2 3	0	白濁	1.5
3	CT	+++	+++	- +	2 7	1	白濁	1.5 2.0
	B	+++	+++	++	2 5	2	白濁	1.0
	A	+++	+++	++	1 2	1	白濁	1.5 2.0
4	CT	+++	+++	++	2 3	0	白濁	1.5
	B	+++	+++	++	2 5	2	白濁	1.0
	A	+++	+++	++	2 6	1	白濁	1.5
5	CT	+++	+++	++	1 7	2	白濁	1.5
	B	+++	+++	++	2 5	2	白濁	1.0
	A	+++	+++	++	3 0	2	白濁	1.5

10

【 0 0 4 4 】

〔 実施例 3 〕

20

代表腸内細菌発育阻害能結果

実施例 1 で調製した培地を用い、代表的な腸内細菌の発育阻害能を比較した。試験方法は、実施例 2 と同様に行った。結果を表 2 に示す。表 2 は、各培地における試験菌株懸濁液の各希釈倍率における発育菌数、色及びコロニーのサイズを示している。

表 2 より、培地 A、培地 B とともに C T 添加培地と同様に各種腸内細菌の発育を抑制することが分った。

【 0 0 4 5 】

【 表 2 】

35℃、18時間培養

30

Strain	Media	Dilution					Color	Size (mm)
		原液	× 10 ⁻¹	× 10 ⁻²	× 10 ⁻³	× 10 ⁻⁴		
<i>E.coli</i> ATCC 11775	CT	0	0	0	0	0	-	非発育
	B	0	0	0	0	0	-	非発育
	A	0	0	0	0	0	-	非発育
<i>P.vulgaris</i> ATCC 13315	CT	0	0	0	0	0	-	非発育
	B	0	0	0	0	0	-	非発育
	A	0	0	0	0	0	-	非発育
<i>C.freundii</i> ATCC 8090	CT	0	0	0	0	0	-	非発育
	B	0	0	0	0	0	-	非発育
	A	0	0	0	0	0	-	非発育

40

【 0 0 4 6 】

〔 実施例 4 〕

緑膿菌発育阻害能結果

実施例 1 で調製した培地を用い、緑膿菌の発育阻害能を比較した。試験方法は、実施例 2 と同様に行った。表 3 は、各培地における緑膿菌の試験菌株懸濁液の各希釈倍率における発育菌数、色及びコロニーのサイズを示している。発育菌数の計測ができない場合は、+ + (一部コロニー融合のため計測不可) および + + + (ほとんどコロニー融合のため計測不可) で表記した。発育コロニーが微小のため計測できないものは、「±」で示した。

表 3 より、培地 A はいずれの希釈倍率においても緑膿菌の発育が抑制されることがわかつ

50

た。また、培地Bでは、希釈倍率 10^{-4} で緑膿菌の発育を完全に抑制できることがわかった。したがって、CT培地と比較して、目的とする大腸菌O157を選択的に分離することができた。

【0047】

【表3】

35℃、18時間培養

Strain	Media	Dilution					Color	Size (mm)
		原液	$\times 10^{-1}$	$\times 10^{-2}$	$\times 10^{-3}$	$\times 10^{-4}$		
<i>Paeruginosa</i> PAO-1	CT	+++	+++	+++	+++	+++	白濁	1-1.5
	B	+++	+++	++	±	0	白濁	微小
	A	0	0	0	0	0	-	非発育
<i>Paeruginosa</i> IFO 3445	CT	+++	+++	+++	+++	+++	白濁	1.5
	B	+++	+++	++	±	0	白濁	微小
	A	0	0	0	0	0	-	非発育
<i>Paeruginosa</i> No.1	CT	+++	+++	+++	+++	+++	白濁	2.0
	B	+++	+++	++	±	0	白濁	微小
	A	0	0	0	0	0	-	非発育
<i>Paeruginosa</i> No.2	CT	+++	+++	+++	+++	+++	白濁	2.0
	B	+++	+++	++	±	0	白濁	微小
	A	0	0	0	0	0	-	非発育
<i>Paeruginosa</i> No.3	CT	+++	+++	+++	+++	+++	白濁	2.0
	B	+++	+++	++	±	0	白濁	微小
	A	0	0	0	0	0	-	非発育

【0048】

〔実施例5〕

腸管出血性大腸菌O157の分離例

成人便1gに対して $10^3 - 10^4$ CFUになるように腸管出血性大腸菌O157を接種し、滅菌生理食塩水を用いて10倍希釈して擬似的に陽性便を作成する。10 μ Lを採取して本発明培地に直接塗抹接種し、35℃で18時間培養した。本発明培地では腸管出血性大腸菌O157と推定されるコロニーが純培養状に生育した。これらのコロニーを釣菌し、大腸菌O157検出キット「UNI」（商品名：関東化学（株））を用いて免疫学的にO157抗原を調べたところ、全て陽性であることが確認された。

【0049】

【発明の効果】

以上のように本発明は、大腸菌、特に腸管出血性大腸菌O157を特異的、高感度かつ簡便に分離することができ、他の偽陽性菌の試験に要していた試薬類の費用、操作の手間および時間を削減できる。また、保菌者検索や汚染された食材や食品を的確に検出でき、食品の安全性および検査費用削減に大きく貢献できる。

10

20

30

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12Q1/00-1/68

C12N1/00-1/38

CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

JSTPlus(JDreamII)

Pubmed